



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 10 984 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 196 10 984.1
㉑ Anmeldetag: 21. 3. 96
㉒ Offenlegungstag: 25. 9. 97

㉓ Int. Cl.⁸:
C 12 N 9/04
C 12 N 15/53
C 12 N 15/74
C 12 P 7/04
C 12 P 7/22
C 07 C 33/22
// (C12N 9/04, C12R
1:225) (C12N 9/04,
C12R 1:24) C12N 1/20

DE 196 10 984 A 1

㉔ Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

㉕ Erfinder:
Hummel, Werner, Dr., 52445 Titz, DE; Riebel, Bettina,
Dipl.-Biol., 50968 Köln, DE

㉖ Alkohol-Dehydrogenase und deren Verwendung zur enzymatischen Herstellung chiraler Hydroxyverbindungen

㉗ Stabiles mikrobielles Enzym mit Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität mit einem Aktivitätsmaximum bei ca. 50°C, Verfahren zu dessen Gewinnung sowie dessen Verwendung zur enantioselektiven Reduktion/Oxidation von organischen Ketoverbindungen/Hydroxyverbindungen, wobei je nach Art der Ausgangsverbindungen R- oder S-Hydroxyverbindungen erhalten werden. Insbesondere hat sich eine Alkohol-Dehydrogenase erhältlich aus *Lactobacillus brevis* als geeignet erwiesen.

DE 196 10 984 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue enantioselektive Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) aus Mikroorganismen, wie beispielsweise der *Lactobacillus*-Art, insbesondere aus *Lactobacillus brevis*. Die neuen Enzyme sind besonders vorteilhaft zur Reduktion von organischen Ketoverbindungen zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen geeignet, wobei diese Reduktionen enantioselektiv zu den entsprechenden R-Verbindungen führen. Der Enantiomerenüberschuß, der sich berechnet nach

$$ee(\%) = \frac{(R)\text{-Produkt} - (S)\text{-Produkt}}{(R)\text{-Produkt} + (S)\text{-Produkt}} \times 100,$$

beträgt dabei in aller Regel mehr als 95%. S-Hydroxy-Verbindungen waren bei Verwendung der erfindungsgemäßen ADH nicht nachweisbar. Aufgrund des breiten Substratspektrums können mit dem erfindungsgemäßen Enzym beispielsweise chirale Alkohole, chirale Hydroxyester (beispielsweise α - und β -Hydroxyester) oder auch Hydroxysäuren hergestellt werden.

Optisch aktive Hydroxyverbindungen sind wertvolle chirale Bausteine, die mit klassischen chemischen Verfahren schwer zugänglich sind. Zur Herstellung chiraler Verbindungen werden daher in der Regel biotechnologische Verfahren in Betracht gezogen, entweder unter Verwendung ganzer Mikroorganismen-Zellen oder mittels isolierter Enzyme. Wie beispielsweise die Veröffentlichung von F. Aragozzini et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1986) 24, 175—177 zeigt, ergeben Verfahren mit ganzen Zellen häufig niedrige Ausbeuten, einen nur geringen Enantiomerenüberschuß (d. h. niedrige ee-Werte) und lange Umsetzungszeiten, so daß Enzyme, die in gereinigter und konzentrierter Form eingesetzt werden können, vorteilhafter sind. Für chirale Hydroxyverbindungen, wie beispielsweise Alkohole, bieten sich Alkohol-Dehydrogenasen an, die die prochirale Verbindung mit Hilfe eines Coenzym (häufig NADH oder NADPH) reduzieren. Diese Reaktionen sind in der Regel hoch enantioselektiv. Die bisher verfügbaren Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) führen alle zu S-Alkoholen, teilweise ist bei diesen Enzymen das Substratspektrum relativ schmal (Hefe-ADH, Pferdeleber-ADH). Eine NADP-abhängige Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* ist in DE 40 14 573 C1 beschrieben.

Diese führt zu R-Alkoholen. Es hat sich allerdings gezeigt, daß dieses Enzym relativ instabil ist, eine Reinigung bis zum homogenen Enzym war somit nur unter großen Verlusten (> 98%) möglich.

Durch intensives Screening konnte nun überraschenderweise eine R-spezifische Alkohol-Dehydrogenase mit deutlich höherer Stabilität gefunden werden. Bestimmt man die thermische Desaktivierung dieses Enzyms im Vergleich zu dem ähnlichsten bekannten ADH-Enzym, zeigt sich, daß das bekannte Enzym bei bereits 45°C zu 50% inaktiviert wird, während das erfindungsgemäße Enzym erst bei Temperaturen von ca. 65°C zu 50% inaktiviert ist. Die höhere Thermostabilität bedeutet zudem eine höhere Lagerstabilität bzw. Stabilität unter bestimmten Reaktionsbedingungen.

Ein entsprechend stabiles R-ADH-Enzym konnte insbesondere in Mikroorganismen der Gattung *Lactobacillus*, wie *L. brevis* und der Untergruppe *Betabacterium* (Gruppe A) gefunden werden. Bisher war von keinem Mikroorganismus bzw. Organismus bekannt, daß er eine stabile R-spezifische Alkohol-Dehydrogenase aufweist. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen das *L. kefir* ADH-Protein konnte nun gezeigt werden, daß alle *Lactobacilli* der Untergruppe *Betabacterium* (Gruppe A) ein entsprechendes mit dem Antikörper reagierendes Protein besitzen. Eine besonders gute enzymatische Aktivität ist dagegen insbesondere bei *Lactobacillus brevis* nachweisbar. Die anderen Stämme dieser Gruppe besitzen jedoch ebenfalls ein für solche Umsetzungen prinzipiell geeignetes Enzym, auch wenn sie unter den gegebenen Anzucht- und Testbedingungen etwas geringere Aktivität zeigen. *Lactobacilli* anderer Untergruppen (*Thermobacterium*, IA, *Streptobacterium* IB, *Betabacterium* Gruppe B) zeigen dagegen weder eine Reaktion im Antikörper-Test, noch verfügen sie über entsprechende enzymatische Aktivität.

Das stabile, aus *L. brevis* erhaltene Enzym konnte bis zur Homogenität gereinigt werden. Entsprechende Daten zur Proteinsequenz wurden mit dem gereinigten Enzym ermittelt. Ein Sequenz-Vergleich der N-terminalen Aminosäuren zeigt, daß zwar größere Übereinstimmungen zwischen dem erfindungsgemäßen stabilen Enzym und ADHs anderen mikrobiellen Ursprungs vorliegen, einige Aminosäuren jedoch ausgetauscht sind.

Die nachfolgend aufgeführte biochemische Charakterisierung zeigt weitere Unterschiede des erfindungsgemäßen Enzyms gegenüber entsprechend bekannten Enzymen, z. B. bezüglich der relativen Aktivitäten gegenüber Ketonen. Die maximale Stabilität der erfindungsgemäßen ADH liegt beispielsweise bei einem pH-Wert von ca. 9,0. Eine gute Stabilität weist das Enzym darüber hinaus bei ca. pH 5,5 auf. Dies gilt beispielsweise in einem 50 mM MES-Puffer (MES = 2-Morpholinoethansulfonsäure). Im selben Puffersystem zeigt das erfindungsgemäße Enzym nach ca. 30 Minuten bei einer Temperatur zwischen 25°C bis 60°C noch eine Restaktivität von über 95%. Ein Stabilitätsmaximum weist das Enzym bei ca. 40°C auf. Ferner besitzt das Enzym ein Aktivitätsmaximum bei ca. 50°C.

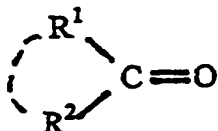
Das erfindungsgemäße Enzym unterscheidet sich zudem auf Aminosäuresequenzebene von bekannten ADH-Enzymen. Beispielsweise weist das N-terminale Ende fünf Aminosäureaustausche auf einer Gesamtlänge von 38 Aminosäuren (AS) auf, was einen AS-Unterschied von über 12% bedeutet. Sämtliche Vergleiche zeigen somit, daß es vorteilhaft ist, für entsprechende Anwendungen die erfindungsgemäße Alkohol-Dehydrogenase, insbesondere die aus *Lactobacillus brevis* zu verwenden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Gewinnung des erfindungsgemäßen Enzyms aus geeigneten Mikroorganismen. Gute Enzymausbeuten wurden mit einem Stamm von *Lactobacillus brevis* erzielt, der unter der Nummer DSM 20054 am 06.06.1972 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, hinterlegt wurde und frei zugänglich ist.

Das Verfahren zur Gewinnung bzw. Reinigung des ADH-Enzyms läuft im wesentlichen über folgende Verfahrensschritte: Aufschluß der kultivierten Zellen, beispielsweise mechanisch durch Glasperlen, Durchführung einer hydrophoben Chromatographie bzw. Interaktionschromatographie und anschließender Anionenaustausch- sowie Affinitätschromatographie. Es hat sich insbesondere als vorteilhaft erwiesen, wenn sämtliche Homogenisa-

tion- bzw. Elutionspuffer ca. 0,5 bis 5 mM Magnesium enthalten. Als besonders vorteilhaft hat sich hierbei eine Mg^{2+} -Konzentration von ca. 1 mM erwiesen. Auf diese Weise wird das Enzym mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 400 U/mg, in vielen Fällen bis zu 500 U/mg gewonnen.

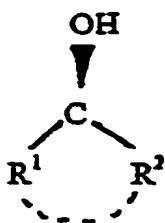
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von organischen Ketoverbindungen gemäß der allgemeinen Formel (I)



(I)

wobei R^1 und R^2 , verschieden oder identisch, Wasserstoff, zusammen oder jeweils, ein geradkettiger oder verzweigter Alkyl- oder Alkenylrest, ein Aryl- oder Arylenylrest, jeweils aus 1 bis 20 C-Atomen bestehend, die durch ein oder mehrere Halogenatome, Nitro-, Hydroxyl- oder Alkoxyreste, wobei die Alkoxyreste 1 bis 20 C-Atome aufweisen, eine gegebenenfalls substituierte Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelheterocyclen substituiert sind, oder ein gegebenenfalls substituiertes polykondensierter gesättigter und/oder ungesättigter aromatischer Rest sein können, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Ketoverbindung bzw. ein entsprechendes Gemisch mit einer erfindungsgemäßen mikrobiellen Alkohol-Dehydrogenase behandelt. Hierbei kann sowohl das erfindungsgemäße Enzym als solches, als auch eine Kultur von Mikroorganismen, welche dieses Enzym produzieren, bzw. das Enzym enthaltene Zellen verwendet werden. Die Reaktion erfolgt vorzugsweise in einem wäßrigen Puffer, z. B. Kaliumphosphat-, Tris/HCl- oder Triethanolamin (TEA)-Puffer in Gegenwart von Magnesiumionen, bei einem pH-Wert von 5 bis 10, vorzugsweise pH 6 bis 9, und einer Temperatur von 10° bis 70°C, vorzugsweise von 30° bis 60°C. Ferner sind in dem Reaktionsansatz ein entsprechendes Coenzym, wie z. B. NAD(P)H sowie ein zur Regenerierung von oxidiertem Coenzym geeignetes Mittel, wie beispielsweise Isopropanol vorhanden. Wenn ein ausreichender Umsatz, wie vorzugsweise ein 50%iger Umsatz erreicht ist, wird die Reaktion abgebrochen, vorzugsweise durch direkt anschließende Extraktion, wie beispielsweise in Chloroform. Die Reaktion kann jedoch auch durch Erniedrigung des pH-Wertes, durch Erhitzen oder Zugabe eines geeigneten Enzyminhibitors abgebrochen werden. Anschließend daran wird die erhaltene enantiomerenreine R-Hydroxyverbindung mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel extrahiert und gemäß bekannten Verfahren durch Chromatographie oder Destillation von nicht umgesetzter Ketoverbindung bzw. anderen Ausgangsverbindungen bzw. Komponenten abgetrennt. Die Enantiomerenreinheit wird zweckmäßigerweise über GC und/oder HPLC an einem chiralen Säulenmaterial oder über ein Polarimeter bestimmt. Insbesondere hat sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Reduktion von Ketonen, Ketoestern wie α -, β - oder γ -Ketoestern, bzw. cyclischen Aryl- und Alkylestern, bevorzugt von solchen mit durch beispielsweise Halogen- bzw. Alkyl- substituierten Resten, als geeignet erwiesen. Besonders gute Ergebnisse konnten bei Acetophenonderivaten, Methylcyclohexanon, bestimmten Diketonen, wie 2,4-Pentandion, verschiedenen Acetessigsäureestern sowie Alkylestern, wie beispielsweise Ethylpyruvat erzielt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer enantioselektiven Hydroxyverbindung gemäß der allgemeinen Formel (II)



(II)

wobei R^1 und R^2 jeweils die oben angegebenen Bedeutungen haben, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein racemisches Gemisch einer organischen Hydroxyverbindung mit einer erfindungsgemäßen mikrobiellen Alkohol-Dehydrogenase bzw. die ADH enthaltene Zellen in einem wäßrigen Puffer bei einem pH-Wert von 5 bis 10, vorzugsweise pH 6 bis 9 und einer Temperatur von 10° bis 70°C, vorzugsweise von 30° bis 60°C, behandelt und anschließend die erhaltene enantiomerenreine S-Hydroxyverbindung isoliert. Ansonsten gelten die oben genannten bzw. dem Fachmann für entsprechende Reaktionen bekannten Bedingungen.

Die erfindungsgemäße ADH kann für die beschriebenen Reaktionen entweder vollständig oder teilweise gereinigt bzw. in Zellen enthaltend eingesetzt werden. Die Zellen können dabei nativ, permeabilisiert oder lysiert vorliegen.

Die Erfindung wird in nachfolgenden Beispielen näher erläutert:

Beispiel 1

Screening nach R-Alkohol-Dehydrogenasen unter Stämmen der Gattung *Lactobacillus*

Die Gattung *Lactobacillus* wird aufgrund von physiologischen Merkmalen taxonomisch in drei Untergruppen

aufgetilt: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* und *Betabacterium*, letztere noch einmal in die beiden Untergruppen A und B. Mit einem Antikörper gegen die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* wurden Typstämme aller Untergruppen getestet, ob sie eine Reaktion gegen den Antikörper zeigen. Überraschenderweise zeigten alle getesteten Stämme der Untergruppe A von *Betabacterium* Reaktivität, alle anderen Stämme waren dagegen inaktiv. Rhextrakte der Stämme der Untergruppe A von *Betabacterium* wurden daraufhin im Enzymtest getestet, inwieweit auch enzymatische Aktivität vorliegt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Diese zeigt, daß unter den gegebenen Anzucht- und Testbedingungen mehrere Stämme dieser Untergruppe keine oder nur schwache Enzymaktivität zeigen, obwohl der Antikörpertest positiv ausfiel. Auffallend war allerdings eine besonders hohe Enzymaktivität an ADH in Proben von *Lactobacillus brevis*.

Tabelle 1

Vorkommen von R-Alkohol-Dehydrogenase in Stämmen der Gattung *Lactobacillus*

Stamm	Reaktivität im Antikörper-Test	Enzymaktivität (Acetophenon-Reduktion) [U/ml]
Thermobacterium		
<i>L. acidophilus</i>	0	0
<i>L. helveticus</i>	0	0
<i>L. bulgaricus</i>	0	0
<i>L. delbrueckii</i>	0	0
<i>L. salivarius</i>	0	0
Streptobacterium:		
<i>L. casei</i>	0	0
<i>L. plantarum</i>	0	0
<i>L. alimentarius</i>	0	0
<i>L. curvatus</i>	0	0
<i>L. coryneformis</i>	0	0
<i>L. farciminis</i>	0	0
Betabacterium Gruppe A:		
<i>L. kefir</i>	+	87,0
<i>L. brevis</i>	+	93,0
<i>L. cellobiosus</i>	+	0,9
<i>L. fermentum</i>	+	0,2
<i>L. viridescens</i>	+	0,2
<i>L. confusus</i>	+	0,3
<i>L. buchneri</i>	0	0,8
Betabacterium Gruppe B:		
<i>L. hilgardii</i>	0	0
<i>L. fructivorans</i>	0	0

Beispiel 2

Gewinnung und Reinigung von Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*

A. Kultivierung von *Lactobacillus brevis*

Zur Enzymgewinnung wurde *Lactobacillus brevis* in folgendem Medium angezogen (Angaben g/L): Glucose (20), Hefeextrakt (5), Trypton (10), Fleischextrakt (5), Di-Ammoniumhydrogencitrat (2), Natriumacetat (5), Magnesiumsulfat (0.1), Mangansulfat (0.05), Di-Kaliumhydrogenphosphat (2).

Die Lösung wurde auf 1 L aufgefüllt und der pH-Wert auf 6.5 eingestellt, anschließend wurde das Medium bei 121°C (2 bar) für 10 min sterilisiert. Der Stamm wird ohne weitere Sauerstoffzufuhr oder pH-Regulierung bei 30°C kultiviert.

Im 10 L Maßstab wurde das Medium im Fermenter nach Sterilisation und Temperierung auf 30°C mit einer 4%igen Vorkultur (OD_{660} 0.35) beimpft. Für diesen Ansatz wurde beispielhaft der Verlauf des Zellwachstums und der Enzymaktivität über die Zeit bestimmt, indem zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen wurden, die dann auf OD_{660} , Frischgewicht und Enzymaktivität nach Aufschluß der Zellen untersucht wurden. In Abb. 1 ist ein solcher Verlauf dargestellt, die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase aus *L. brevis* zeigt nach Erreichen der stationären Phase des Wachstums den maximalen Aktivitätswert, der nur für 1.5 h gehalten wird.

Im 220 L Maßstab wurde der Organismus unter den gleichen Bedingungen kultiviert, nach 13 h bei einem pH-Wert von 5.3 und einer OD_{660} von 2.2 wurden nach Zentrifugation 700 g Zellmasse gewonnen. Die Zellmasse kann bei -20°C gelagert werden, ohne daß über mehrere Monate ein Aktivitätsverlust meßbar ist. Fig. 1 zeigt das Wachstum (dargestellt als optische Dichte) und die Enzymbildung (U/G Zellen und U/mg Protein) in Abhängigkeit von der Fermentationszeit.

B. Enzymisolierung (Rohextraktherstellung)

Die Enzymfreisetzung aus den Zellen wurde durch Naßvermahlung mit Hilfe von Glasperlen (0.3 mm) erreicht, kann aber auch durch jede andere Methode zum Aufschluß von Bakterienzellen erzielt werden. Die Bakterienmasse wird mit 0.1 M Acetatpuffer pH 4.0 + 1 mM $MgCl_2$ unter Zusatz von Antischaummittel (Polypropylenglycol) zu einer 40%igen Suspension verdünnt. Diese wurde unter Zugabe von Glasperlen im Verhältnis von 1 : 2 im Disintegrator (Fa. IMA) bei 4000 rpm einem 20minütigen Aufschluß bei ständiger Kühlung unterzogen. 8 g Bakterien ergaben 10 ml Rohextrakt mit einer Volumenaktivität von 40 U/ml und einem Proteingehalt von ca. 3 mg/ml. Der Enzymtest enthält 970 µl Triethanolaminpuffer (100 mM; pH 7.0; mit 11 mM Acetophenon), 20 µl NADPH (Endkonzentration 0.19 mM) und Enzymlösung.

Definition der Enzymeinheiten: 1 U entspricht der Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 µmol Substrat (Acetophenon) pro 1 min umzusetzen.

C. Reinigung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*

Das Enzym kann über hydrophobe Interaktions-Chromatographie mit nachfolgenden Anionenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie bis zur Homogenität gereinigt werden. Dabei empfiehlt sich ein Zusatz von Mg^{2+} -Ionen von ca. 1 mM zu allen Puffern. Bei Entzug dieser Ionen kann das Enzym irreversibel geschädigt werden.

1. Hydrophobe Interaktionschromatographie

5 ml eines Rohextrakts (entsprechend Beispiel 2 B) werden über kleine Gelfiltrationssäulen (PD10, Pharmacia) in 50 mM Triethanolaminpuffer pH 7.0 mit 1 mM $MgCl_2$ und 0.6 M $(NH_4)_2SO_4$ umgepuffert und auf eine Phenyl-Sepharose CL-6B (Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Die Säule ist mit 50 mM Triethanolaminpuffer pH 7.0, 1 mM $MgCl_2$ und 0.6 M $(NH_4)_2SO_4$ äquilibriert worden. Nach Auftrag und Spülen der Säule mit dem Äquilibrierungspuffer wird das Enzym mit einem fallenden linearen Salzgradienten (6 bis 0 M $(NH_4)_2SO_4$, Fluß 1 ml/min) bei 0.36 M $(NH_4)_2SO_4$ eluiert. Die aktiven Fraktionen werden zusammengefaßt und auf eine Konzentration von 1.2 M $(NH_4)_2SO_4$ gebracht. Diese Proteinlösung wird auf eine Octyl-Sepharosesäule aufgetragen, die mit 50 mM Triethanolaminpuffer pH 7.0, 1 mM $MgCl_2$ und 1.2 M $(NH_4)_2SO_4$ äquilibriert wurde. Nach Auftrag der Proteinlösung und anschließendem Spülen der Säule wird das Enzym mit einem fallenden linearen Salzgradienten (1.2 bis 0 M $(NH_4)_2SO_4$, Fluß 1 ml/min) bei 1.0 M $(NH_4)_2SO_4$ eluiert. Die erzielte Anreicherung ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

2. Anionenaustauschchromatographie

Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität der letzten oben verwendeten Säule werden über Gelfiltrationssäulen (PD10, Pharmacia) in 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 9.0 mit 1 mM $MgCl_2$ umgepuffert und auf eine ebenso äquilibrierte Mono Q-Säule (Fluß 1 ml/min; Druck 1.5 MPA; FPLC-Chromatographiesystem; Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Nach erfolgtem Spülen der Säule wird die Alkohol-Dehydrogenase mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 0.6 M NaCl eluiert, wobei das Enzym bei 0.36 M NaCl erscheint.

3. Affinitätschromatographie

Die aktiven Fraktionen werden über Gelfiltrationssäulen (PD10, Fa. Pharmacia), die mit 50 mM Morpholinethansulfonsäurepuffer pH 5.5 und 1 mM $MgCl_2$ äquilibriert wurden, umgepuffert und auf eine ebenso äquilibrierte 2',5'-AMP-Sepharosesäule (Fa. Pharmacia) aufgetragen. Anschließend wird mit 100 mM NaCl, gelöst im gleichen Puffer, gespült. Anschließend erfolgt die Elution mit einem linearen NADP-Gradienten von 0 bis 10 mM

NADP. Die Dehydrogenase eluiert bei 3.33 mM NADP. Die Chromatographie wurde mit einer Flußrate von 0.25 ml/min durchgeführt. Die komplette Reinigung des Enzyms ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Reinigung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*

Reinigungsschritt	Aktivität [U/ml]	spez. Akt. [U/mg]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	40.8	14.78	100
Phenylsepharose	17.21	45.23	42
Octylsepharose	4.6	92	8
Mono Q	2.47	183	4
2',5'-AMP-Seph.	11.74	489	3

D. Reinigung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir*

Lactobacillus kefir besitzt eine intrazelluläre NADP-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (DE 40 14 573 C1), die in einigen biochemischen Eigenschaften (Produktion von R-Alkoholen, Coenzym-Spezifität) der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* ähnelt. Um die Unterschiede beider Enzyme deutlich zu machen und die Vorzüge des Enzyms aus *L. brevis* aufzuzeigen, wurde die Alkohol-Dehydrogenase aus *L. kefir* analog zum *L. brevis*-Enzym bis zur Homogenität gereinigt und im Verlauf der Charakterisierung des *L. brevis*-Enzyms mitunter vergleichend geprüft (z. B. Temperaturstabilität, N-terminale Aminosäure-Sequenz). Anzucht von *Lactobacillus kefir*, die Enzymisolierung und Reinigung bis zum homogenen Enzym wurden wie in Beispiel 2A)–2C) für *L. brevis* beschrieben durchgeführt. Tabelle 3 faßt die Reinigung des *L. kefir*-Enzyms zusammen.

Tabelle 3

Reinigung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir*

Reinigungsschritt	Aktivität [U/ml]	spez. Akt. [U/mg]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	57.5	9.15	100
Phenylsepharose	90.0	49	31
Octylsepharose	7.5	100	26
Mono Q	17.5	206	23
2',5'-AMP-Seph.	48.8	174	8.5

Beispiel 3

Biochemische Charakterisierung der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*

A. pH-Stabilität

Die Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms bei Lagerung in Puffern mit verschiedenen pH-Werten wurde im Bereich von pH 4 bis 11 untersucht. Es wurden je nach Pufferkapazität verschiedene Puffer im pH-Bereich von 4 bis 11 angesetzt und das homogene Enzym darin für 30 min inkubiert. Davon wurde 1 µl entnommen und zu dem normalen Testansatz von 970 µl Triethanolaminpuffer (100 mM; pH 7.0 mit 11 mM Acetophenon) und 20 µl NADPH (Endkonzentration 0.19 mM) hinzugeben. Die Reaktion wurde über 1 min bei 30°C und 340 nm verfolgt. Dabei zeigten sich 2 Maxima der pH-Stabilität, ein kleineres bei pH 5.5 und ein großes bei pH 9.0. Die Stabilität ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 4

pH-Stabilität der Alkohol-Dehydrogenase

4,0	Na-acetat / Essigsäure	6,86	5
4,5	Na-acetat / Essigsäure	6,22	
5,0	MES / NaOH	7,04	
5,5	MES / NaOH	8,73	10
6,0	Triethanolamin / NaOH	5,58	
6,5	Triethanolamin / NaOH	5,80	
7,0	Triethanolamin / NaOH	6,57	15
7,5	Tris / HCl	5,04	
8,0	Tris / HCl	3,83	
8,5	Tris / HCl	8,42	
9,0	Tris / HCl	17,11	20
10,0	Glycin / NaOH	1,25	
11,0	Glycin / NaOH	2,43	25

B. Temperaturstabilität

In analoger Weise wie unter A. beschrieben wurde die Temperaturstabilität für den Bereich von 25 bis 70°C bestimmt. Die homogene Enzymlösung wurde für 30 min den jeweiligen Temperaturen ausgesetzt und anschließend direkt bei 30°C mit dem obigen Testansatz gemessen. Die Alkoholdehydrogenase ist in dem Temperaturbereich zwischen 25 und 60°C für den angegebenen Zeitraum stabil (s. Tabelle 5), sie zeigt ein Maximum bei 40°C. Demgegenüber ist die ADH aus *L. kefir* nur bis 40°C stabil mit einem Maximum bei 37°C, danach sinkt die Aktivität rapide ab. Das Maximum dieses Enzym liegt bei 37°C.

Tabelle 5

Temperaturstabilität der Alkohol-Dehydrogenase aus *L. brevis*

<i>L. brevis</i> Temperatur [°C]	<i>L. brevis</i> Aktivität [U/ml]	<i>L. kefir</i> Temperatur [°C]	<i>L. kefir</i> Aktivität [U/ml]	
25	9,43	25	36,5	45
30	8,74	30	30,2	
37	12,06	37	35,8	
40	12,15	40	32	50
42	11,16	45	26,2	
45	10,81	50	2,4	
47	8,23	55	0	55
50	8,37			
60	8,51			
70	0,56			60

C. Temperaturoptimum

Zur Bestimmung der optimalen Testtemperatur wurde die Enzymaktivität zwischen 25 und 70°C gemessen. Der Testansatz entsprach den Standardkonzentrationen an Acetophenon und NADPH und wurde jeweils 5 min bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Das Enzym hat seine optimale Testtemperatur bei 50°C, wie aus der Tabelle 6 ersichtlich wird. Die Alkohol-Dehydrogenase aus *L. kefir* hat dagegen ein Optimum von 37°C und bei höheren Testtemperaturen als 45°C sinkt die Aktivität rapide ab (Tabelle 5).

Tabelle 6

Temperatur-Optimum für die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (im Vergleich zu der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir*)

L. brevis Temperatur [°C]	L. brevis Aktivität [U/ml]	L. kefir Temperatur [°C]	L. kefir Aktivität [U/ml]
25	10.31	20	28.0
30	9.66	25	28.2
37	9.76	30	35.2
40	17.78	35	36.2
42	16.93	40	34.4
45	18.06	45	35.4
47	19.13	50	26.0
50	31.46	55	3.0
55	24.48	60	0
60	23.69		
65	1.98		
70	0.58		

D. Substratspektrum der Alkohol-Dehydrogenase

Es wurden anstelle von Acetophenon eine Reihe von anderen Ketonen und Ketoestern und getestet, ob diese enzymkatalysiert reduziert werden können.

Folgender Testansatz wurde dafür verwendet:

970 µl Triethanolaminpuffer (50 mM; pH 7.0, mit 10 mM Ketoverbindung)

20 µl NADPH (0.19 mM im Test)

10 µl gereinigtes Enzym (s. Beispiel 2, nach Affinitätschromatographie, 1 : 10 verdünnt).

Teilweise wurden die Ketone auch in einer Konzentration von 1 mM getestet, um eine mögliche Substrathemmung bei 10 mM zu verifizieren. Es stellte sich jedoch heraus, daß eine solche Überschuß-Inhibierung bei einer Keton-Konzentration von 10 mM nicht auftrat. Die für die entsprechenden Substrate erhaltenen Aktivitäten sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Für Substrate wie p-Cl-Acetophenon, Methyl-1-naphtylketon und Methylcyclohexanon kann aufgrund von Literaturangaben ein direkter Vergleich zwischen der Alkohol-Dehydrogenase aus *L. kefir* und der aus *L. brevis* gezogen werden (Hummel, W. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1990), 34, 15—19). Dieser Vergleich zeigt, daß die erfindungsgemäße ADH die genannten Verbindungen mit höherer Aktivität umsetzt; die Aktivitäten liegen ca. um 50 bis 100% höher als die für ADH aus *L. kefir*.

Tabelle 7

Substratspektrum der Alkohol-Dehydrogenase aus *L. brevis*

Substrat	Aktivität [U/ml]	Relative Akt. [%]
Acetophenon	3.26	100
4-Cl-Acetophenon	6.63	203
3-Cl-Acetophenon	4.80	147
2-Cl-Acetophenon	0.33	10
4-Ethylacetophenon	2.13	65
2-Methylcyclohexanon	6.25	192
2-Oxo-4-phenylbuttersäureethylester	4.60	141
2,4-Pentandion	4.22	130
Acetessigsäurebenzylester	4.11	126
Acetessigsäuremethylester	3.81	117
Acetessigsäureethylester	3.54	109
Benzylacetone	3.24	99
Methylpyruvat	3.22	98
Ethylpyruvat	8.10	248
4-Cl-Acetessigsäureethylester	3.04	93
Laevulinsäureethylester	2.99	92
4-Acetylbuttersäureethylester	2.84	87
3-Oxo-n-valeriansäureethylester	2.29	70
3-Oxo-n-valeriansäuremethylester	2.26	69
Ethylbutyrylacetat	2.21	68
Acetessigsäurebutylester	2.07	64
Isobutyrylessigsäureethylester	1.93	59
Methyl-1-naphthylketon	1.21	37
Benzoylessigsäureethylester	1.14	35
Ethyl-2-methylacetoacetat	0.84	26
1,4-Butandiol-diglycidylether	0.77	24
Hydroxyacetone	0.74	23
Propiophenon	0.55	17
Trifluoracetessigsäureethylester	0.50	15
Cyclohexanon-2-carbonsäureethylester	0.41	13
Ethyl-2-oxo-4-phenylbutyrat	0.40	12
Benzylmethylketon	0.36	11
4-Acetylbuttersäure	0.32	10
Benzaldehyd	0.30	9
Ketovaleriansäure	0.27	8
Cyclohexanon-2-essigsäureethylester	0.14	4

E. M. Molekulargewicht der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*

Gereinigte Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* wurde auf eine Gelfiltrationssäule Superdex G-200 (Fa. Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Das Molekulargewicht wurde gemäß einer Eichgerade, die mit

Proteinen bekannten Molekulargewichts erhalten wurde, bestimmt. Der Puffer bei der Gelfiltration hatte den für die Reinigung üblichen pH-Wert von 7.0 (100 mM TEA, pH 7.0, 0.2 M NaCl, 1 mM MgCl₂). Unter diesen Bedingungen wurde für die *L. brevis*-ADH ein Molekulargewicht von ca. 104 kD bestimmt, was dem der *L. kefir*-ADH entspricht.

F. Bestimmung der N-terminalen Sequenz der Alkohol-Dehydrogenase

Die N-terminale Sequenz wurde mit einem Pulsed Liquid Sequencer Model 477A mit on-line HPLC Model 120A der Firma Applied Biosystems/USA. bestimmt und mit der N-terminalen Sequenz der Alkohol-Dehydrogenase aus *L. kefir* verglichen.

S-N-R-L-D-G-K-V-A-I-V-T-G-G-T-L-G-I-G-L-A-I-A-T-K-F-V-E-E-G-A-K-V-M-I-T-T-R (SEQ. ID NO: 1).

Im Vergleich zur Sequenz aus *L. kefir* wurden bei den ersten 38 Aminosäuren (AS) folgende fünf Aminosäureaustausche verzeichnet:

- Pos. 1 von Thr nach Ser (kein Unterschied im chemischen Verhalten der AS);
- Pos. 2 von Asp nach Asn (saure, geladene AS wird gegen ungeladene ausgetauscht);
- Pos. 5 von Lys nach Asp (basische wird gegen saure AS ausgetauscht);
- Pos. 24 von Asp nach Thr (saure gegen hydrophile AS ausgetauscht);
- Pos. 34 von Val nach Met (hydrophobe gegen schwefelhaltige AS ausgetauscht).

In vier von fünf Fällen liegen solche Aminosäureaustausche vor, die entgegengesetzte Polaritätseigenschaften an diesen Positionen im Enzym hervorrufen.

Beispiel 4

Bestimmung von Aminosäure-Teilsequenzen nach Spaltung des Enzyms

Homogene Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* wurde einer Spaltung mit Endoproteinase Lys-C Protease (Boehringer Mannheim, 476 986) unterworfen. Dafür mußte das Protein vorher denaturiert und carboxymetyliert werden. Die ADH-Probe wurde direkt in 60 µl Guanidinium-Puffer pH 8.5 aufgenommen [2 mg/ml] und bei RT 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde 1/10 Volumen einer 111 mM DTT-Lösung hinzugegeben und erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde 1/10 Volumen einer 360 mM Iodessigsäurelösung hinzugegeben und die Probe für 30 min im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit β-Mercaptoethanol abgestoppt. Nach Umpuffern auf einen Harnstoff-haltigen (2 M) Puffer wurde 1% (Endkonzentration) Triton X-100 (reduziert) und 4.6 µg Lys-C Protease (1/25 der Proteinmenge [w/w]) hinzugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit (mind. 16–18 h) wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/10 Volumen 10% TFA abgestoppt. Von dem Ansatz wurden dreimal je 2 × 150 µl und schließlich 1 × 100 µl in die HPLC eingespritzt. Jeder proteinhaltige Peak wurde getrennt gesammelt und nach Vergleich der einzelnen Laufe gleiche Peaks zusammengenommen und in einer Vakuum-Zentrifuge eingengt. Diese Proben (insgesamt 18) wurden dann direkt zum Sequenzieren verwendet.

Sequenzdaten (aufgeführt sind lediglich die wichtigsten Daten von Fraktionen mit eindeutiger, vollständiger Sequenzinformation):

Das Protein in Peakfraktion Nummer 3 hat folgende Sequenz V-M-I-T-G-R-H-S-D-V-G-E-K (SEQ. ID NO: 2) und knüpfte damit direkt an das N-terminale Ende an.

Die Sequenzen der Proteinfractionen Nummer 5 (D-Y-D-V-R-V-N-T-V-H-P-G-Y-I-K, (SEQ. ID NO: 3)) und Nummer 6 konnten ebenfalls bestimmt werden.

Bei letzterer, F-A-T-G-S-E-F-V-V-D-G-G-Y-T-A-Q (SEQ. ID NO: 4), handelt es sich um das C-terminale Ende des Monomers der ADH aus *Lactobacillus brevis*.

Die Sequenzen der restlichen 12 Fraktionen sind hier nicht angeführt. Sämtliche Teilsequenzen konnten jedoch durch entsprechende Klonierungsexperimente bestätigt werden.

Beispiel 5

Klonierung des Enzyms

A. Präparation genomischer DNA aus *Lactobacillus brevis*

Zellen von *Lactobacillus brevis* wurden mit 50 ml high TE-Puffer (25 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0) gewaschen und bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml TE (25 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0) resuspendiert und unter Zugabe von 100 µl Lysozym (100 mg/ml) für 1.5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde über Nacht bei 50°C unter Zugabe von 340 µl 30% Natriumlaurylsarcosin, 100 µl Qiagen Protease (Qiagen, Hilden; 20 mg/ml) und 25 µl RNase A (40 mg/ml) zu den lysierten Zellen das Zellprotein denaturiert und die RNA abgebaut. Im nächsten Schritt wurde aus dem Zelllysat die DNA durch Phenol-fällungen vom restlichen Zellinhalt abgetrennt. (Dazu wurde immer im Volumenverhältnis 1 : 1 zuerst reines Phenol (mit TE abgesättigt), dann Phenol/IAA/CHCl₃ (25 : 24 : 1) (IAA = Isoamylalkohol) und zuletzt IAA/CHCl₃ (24 : 1) auf die wäßrige Phase gegeben.) Die bereinigten, wäßrigen Phasen wurden durch sanftes Schwenken ca. 5 min lang vermischt und dann durch Zentrifugation bei 20000 rpm getrennt. Die letzte wäßrige Oberphase wurde mit 0.0625 Volumen 8 M LiCl vermischt und dann mit zwei Volumen kaltem Ethanol (100%) vorsichtig

überschichtet. Die an der Grenzschicht ausfallende, genomische DNA wurde auf eine Pasteurpipette aufgewickelt und zweimal mit kaltem, 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge wurde die DNA in 2 ml TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) pH 8.0 aufgenommen. Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der isolierten DNA wurde die Lösung 1 : 50 verdünnt und der Quotient 260 : 280 nm photometrisch als 2,0 bestimmt. Damit konnten Proteinverunreinigungen ausgeschlossen werden. Die Konzentration der DNA wurde aus dem Gel mit 70 ng/µl bestimmt, aus 3 g Zellen wurden 140 µg genomische DNA isoliert. 5

B. Oligonucleotide als 5'- und 3'-Primer für die PCR (Polymerase chain reaction)

Aufgrund enzymatischer Peptidspaltungen (s. Beispiel 4) konnten das N-terminale und C-terminale Ende der Proteinsequenz der ADH aus *L. brevis* bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Informationen wurden Primer für die PCR synthetisiert. Dabei wurden bekannte Präferenzen für bestimmte Codons in Laktobacillen berücksichtigt. Vor jeden 5'primer wurde das Codon ATG (Met) als Startcodon vorgesetzt, was der Proteinsequenz fehlt, und hinter jeden 3'primer wurden 2 Stopcodons als Zeichen für die Beendigung der PCR gesetzt. Die Primerkonstrukte sind im folgenden aufgelistet (In Klammern sind die variablen Nucleinsäuren aufgeführt, die alternativ zu der vor der Klammer stehenden Nukleinsäure eingebaut wurden, so daß der tatsächlich eingesetzte Primer ein Gemisch aus den sich ergebenden Kombinationen ist): 10

5'primer 5'LB:

5'ATG-TCA-AAC-CGT-TTA(G)-GAT-GGT(C)-AAG-GTT(A)-GCT(A)-ATT(C)-3
(SEQ. ID NO:5) 20

3'primer 3'LB:

5'CTA-CTA-TTG-A(T)GC-AGT-GTA-A(G)CC-A(G)CC-ATC-A(T)AC-A(T)AC-GAA-3'
(SEQ. ID NO:6) 25

Die synthetisierten Primer wurden mit kaltem NH₃ von den Säulen eluiert. Diese NH₃-Lösung wurde für 1 h bei 70°C inkubiert und anschließend mit 1 ml Butanol ausgeschüttelt. Die Proben wurden bei 14000 rpm 2 min abzentrifugiert und der entstandene Überstand abdekantiert. Die Proben wurden zum Trocknen 5 min in die Vakuum-Zentrifuge gestellt und das Pellet in 500 µl H₂O aufgenommen. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 pmol/µl eingesetzt. 30

C. PCR (Polymerase chain reaction) mit der genomischen DNA aus *L. brevis*

Im folgenden wurde die Templatekonzentration (genom. DNA) variiert, alle anderen Parameter wurden konstant gehalten. Als Annealingtemperatur wurde 52°C gewählt. 35

Tabelle 8

PCR-Ansatz

Ansatz	Template [ng]	5'-Primer [pmol]	3'-Primer [pmol]	dNTP [nM]	Puffer [10x]	Taq [U]	H ₂ O [µl]	
1	700	1	1	1,6	10 µl	2,5	61,5	50
2	70	1	1	1,6	10 µl	2,5	70,5	

Die jeweiligen Ansätze hatten ein Volumen von 100 µl, die molaren Angaben sind als Endkonzentrationen zu verstehen, das Template und die Taq DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) wurden in der in Tab. 8 aufgeführten Menge dem Gesamtansatz zugegeben. Der Puffer (PCR reaction buffer; Boehringer Mannheim) lag in 10facher Konzentration vor. Die PCR wurde mit 25 Cyclen über Nacht angesetzt. Es wurde ein PCR Gerät von Perkin Elmer mit beheizbarem Deckel verwendet. 60

Für die Analytik wurden 10% des Ansatzes (Volumenanteil) auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei konstant 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR zeigt eine deutliche Amplifikation eines DNASTücks von 750 bp. Das Signal liegt zwischen den Markbändern von 697 bp und 925 bp, wobei es näher an 697 bp reicht. Bei einem durch SDS-PAGE ermittelten Molekulargewichts des Monomers der ADH von 27 kD (245 AS) findet sich hier eine gute Übereinstimmung von Aminosäurelänge des ADH-Proteins und der Basenpaarlänge für das gesuchte Gen. In einem Restriktionsverdau mit den Enzymen Eco R^I und Hind III (4 µl PCR-Fragment, 2 µl Puffer B (Boehringer), 1 µl Eco R^I bzw. Hind III), 13 µl H₂O; Inkubation für 1 Std. bei 37°C; Analytik mittels 65

Agarosegel) konnte nachgewiesen werden, dass das amplifizierte Gen-Fragment keine Restriktionsschnittstellen besitzt.

D. Reinigung der PCR-Produkte mit dem Qiaquick® PCR purification kit (Qiagen, Hilden)

5 Zu 100 µl PCR-Lösung wurden 500 µl Puffer PB pipettiert und direkt auf eine Qiaquick® Säule (ohne Äquilibration) aufgetragen. Die DNA wurde durch Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) an die Säule gebunden, der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl Puffer PE durch Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) gewaschen und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde erneut kurz abzentrifugiert, um Reste des in dem
10 Puffer PE enthaltenen Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde die Säule unter Zugabe von 50 µl 2 mM Tris/HCl pH 8.0 durch Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) eluiert. Von diesem Eluat wurde zur Kontrolle je 1 µl auf ein analytisches 0.8%iges Agarosegel aufgetragen und unter 60 V konstant elektrophoretisch aufgetrennt. Die Konzentrationsbestimmung ergab 70 ng/µl für PCR3/1 und 90 ng/µl für PCR3/2. PCR3/2 wurde weiterverarbeitet, PCR3/1 wurde bei -20°C aufbewahrt. PCR3/2 wurde auf 16 µl in der Speed vac eingeeengt und direkt
15 für die Blunting/kinasing Reaktion des sureclone kits eingesetzt (16 µl PCR, 1 µl Klenow Fragment, 2 µl 10× Puffer, 1 µl Polynucleotidkinase; 30 min bei 37°C inkubieren). Das Reaktionsgemisch wurde direkt auf ein präparatives 0.8% Agarosegel (2 h, 80 V konstant) aufgetragen. Die bei 750 bp sichtbare Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und über Jetsorb® (Genomed, Bad Oeynhausen) aus dem Gel isoliert. Die Plasmid DNA wurde aus dem Jetsorbmaterial mit 50 µl 2 mM Tris/HCl pH 8.0 eluiert. Diese Lösung wurde mit Hilfe einer
20 Vakuumpumpe auf 9 µl eingeeengt. Davon wurde 1 µl für ein analytisches Agarosegel verwendet. Aus der Konzentration des PCR Fragments im Gel (150 ng/µl) ergibt sich eine Gesamtkonzentration an DNA von 1.2 µg. Diese Probe wurde in den Ligaseansatz des sureclone kits eingesetzt.

E. Jetsorb® DNA Isolierung aus dem Gel

25 Pro 100 mg Gelmaterial wurden 300 µl Puffer A1 und 10 µl der Jetsorbsuspension vermischt und bei 50°C für 15 min inkubiert. Dabei wurde von Zeit zu Zeit die Lösung neu gemischt, um eine komplette Bindung an das Jetsorbmaterial zu gewährleisten. Anschließend wurde die Suspension 30 sec bei 11000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 300 µl Puffer A2 resuspendiert und erneut bei 11000 rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde komplett wiederholt und anschließend der Überstand sauber abpipettiert und das Pellet
30 bei 50°C 5 min getrocknet. Dann wurde das Pellet in 30 µl 2 mM Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert und 5 min bei 50°C inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation (11000 rpm, 30 sec) wurde der Überstand gesammelt und das Pellet erneut in 20 µl 2 mM Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert und wie oben weiter behandelt. Die resultierenden Überstände wurden vereinigt und in der Speed vac auf 18 µl eingeeengt. Davon wurde 1 µl auf ein analytisches
35 Agarosegel aufgetragen. Die Konzentrationsbestimmung über dieses Gel ergab eine DNA Konzentration von 10 ng/µl, also eine Gesamtkonzentration von 160 ng.

F. Ligation mit dem Sureclone Kit (Fa. Pharmacia)

40 Eingesetzt wurden 7 µl PCR (1 µg), 1 µl pUC18 Vektor (50 ng), 1 µl DTT, 10 µl zweifachen Ligasepuffer, 1 µl Ligase. Von diesem Ansatz wurden 3 µl entnommen und in einem neuen Ligaseansatz eingesetzt, um die PCR-Fragmentkonzentration zu erniedrigen. Ein zweiter Ansatz entspricht bis auf die PCR-DNA Konzentration (157 ng, d. h. ein Verhältnis von 1 : 3 Vektor : PCR) in der Zusammensetzung dem ersten Ansatz (Verhältnis von 1 : 20 Vektor : PCR). Beide Ansätze wurden für 1,5 h bei 16°C inkubiert und anschließend je 100 µl kompetente Zellen (Escherichia coli XL 1 Blue) damit transformiert. Von Ligaseansatz 1 wurden 1 µl und von Ligaseansatz 2 wurden 4 µl zu den kompetenten Zellen pipettiert. Von der Zellsuspension wurden je 300 µl auf LB_{amp}-Agarplatten ausplattiert (LB = Caseinpepton/Hefeextrakt; pH 7.5).
Gewachsene Kolonien wurden abgeimpft und in 4 ml Flüssigkultur (LB_{amp}-Medium) über Nacht bei 37°C kultiviert. Von dieser Zellsuspension wurden je 2 ml zur Plasmidpräparation (entsprechend dem Qiagen mini-prep Protokoll (Qiagen, Hilden); s. u.) eingesetzt. Die Plasmid DNA wurde aus der zellfreien Lösung direkt mit
50 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt, mit 70% kaltem Ethanol gewaschen, in der Vakuumpumpe getrocknet und in 10 µl 2 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8.0) aufgenommen. Von dieser Plasmidpräparation wurde ein Restriktionsverdau mit Eco R1 und Hind III angesetzt (1 U/µl Enzym, 6 µl Plasmid DNA, 37°C, 1 h). Der komplette Verdau wurde auf ein 0.8%iges Agarosegel aufgetragen, 2 Std. bei konstant 80 V elektrophoretisch aufgetrennt
55 (Nachweis des 750 kb-Inserts) und die Plasmide daraufhin gegebenenfalls für die Sequenzierung eingesetzt.

G. Plasmid-Präparation (Qiagen Miniprep)

4 ml der Flüssigkultur wurden bei 5000 rpm 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 300 µl Puffer P2 gegeben und die Zellsuspension bei Raumtemperatur für
60 5 min inkubiert. Anschließend wurde den lysierten Zellen 300 µl kalter Puffer P3 hinzupipettiert und für 10 min auf Eis unter mehrmaligem Schwenken inkubiert, um Nukleinsäuren und Proteine zu denaturieren. Die denaturierten Bestandteile wurden durch Zentrifugation (11000 rpm, 15 min) abgetrennt; der Überstand direkt auf neue, mit 1 ml QBT Puffer (Qiagen, Hilden) äquilibrierte Qiagen 20 Tip Säulen (Qiagen, Hilden) gegeben. Die
65 Säulen wurden mit 4 × 1 ml Puffer QC gewaschen und anschließend die Plasmid DNA mit 0.8 ml Puffer QF von den Säulen eluiert. Aus dieser Lösung wurde die DNA mit 0.7 Vol Isopropanol nach 30 min Zentrifugation bei 14000 rpm gefällt. Das resultierende Pellet wurde 2 × 10 min mit 70% Ethanol während der Zentrifugation bei 14000 rpm gewaschen und dann in der Vakuumpumpe getrocknet. Die DNA wurde in 10 µl 2 mM Tris/HCl

pH 8,0 aufgenommen und beispielsweise für Analysen mittels Restriktionsenzymen eingesetzt.

H. DNA Sequenzierung der Plasmide

a. Fertigen des Sequenzgels

Die Sequenzierung wurde mit dem autoread laser fluorescent Sequencer (ALF) der Firma Pharmacia durchgeführt, dementsprechend wurde der autoread Sequencing kit (Pharmacia) für die Sequenzierungsreaktion verwendet. Das Gel wies standardmäßig eine Dicke von 0,5 mm auf. An der Stelle des Laserdurchtritts wurde ein entsprechendes Glasplättchen (Dicke 0,35 mm) eingesetzt. Sequenzgels: 21 g Harnstoff (ultra pure), 12 g H₂O (Millipore), 7,5 ml Acrylamid (Roth, zur DNA Sequenzierung), 200 µl APS, 45 µl TEMED, 6 ml 10-fach TBE. Als Laufpuffer diente 0,6 × TBE (Tris/Borat/EDTA-Puffer entsprechend Pharmacia-Angaben).

b. Sequenzierungsreaktion mit dem AutoRead™ Sequencing kit

Von den Plasmiden wurden je 5 µl (4 µg) DNA pro sequencing primer eingesetzt.

Es wurden 5 µl Plasmid DNA, 5 µl H₂O, 2 µl Primer (universal oder reversal), 1,5 µl 1 M NaOH zusammenpipettiert und für 5 min bei 65°C zur DNA Denaturierung inkubiert. Dann wurden die Proben direkt nach 37°C überführt und die Reaktion mit 1,5 µl 1 M HCl neutralisiert. Es wurden 2 µl Annealingpuffer hinzugegeben, kurz abzentrifugiert (15 sec, 14000 rpm) und 10 min bei 37°C, anschließend weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurden 1 µl Extensionpuffer und 3,5 µl Dimethylsulfoxid mit dem Ansatz vermischt und pro Ansatz 2 µl der mit Enzymdilutionspuffer verdünnten T7-Polymerase pipettiert. 5,2 µl dieser Lösung wurden direkt in eine bei 37°C vorinkubierte Platte pipettiert, die pro Plasmid 4 Spuren mit 3 µl des jeweiligen NTP-Mixes (A, C, G, T, in der Reihenfolge) enthielt. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde die Sequenzierungsreaktion nach Sanger (Sanger, F., Nickler, S., Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467) durch Zugabe von 6 µl Stopmix abgestoppt, und das Reaktionsgemisch für 2–3 min bei 90°C erhitzt, danach direkt auf Eis gekühlt, um ein Renaturieren der Stränge zu verhindern. Dann wurden direkt 6 µl dieses Gemisches auf das Sequenzgel aufgegeben und der Sequencer gestartet. Von den ausgewählten Plasmiden wies nur das Plasmid 3/1 die richtige DNA-Sequenz auf; diese Daten können nun in die entsprechende Proteinsequenz übersetzt werden (Abb. 1). Der universal Primer zeigt das C-terminale Ende der Sequenz und der reversal Primer das N-terminale Ende (5'codierender Strang). Daher ist das Insert in der richtigen Orientierung plziert. Die Sequenz auf Grund der DNA-Sequenzierung zeigt völlige Übereinstimmung mit den durch Proteinsequenzierung erhaltenen Sequenzdaten.

Beispiel 6

Enzymkatalysierte Herstellung von R-Phenylethanol

Für die enzymkatalysierte Synthese von (R)-Phenylethanol aus Acetophenon wurden gereinigtes Enzym (Beispiel 2C) und das erforderliche Coenzym (NADP) eingesetzt. Das oxidierte Coenzym wurde durch gleichzeitig anwesendes Isopropanol kontinuierlich regeneriert, so daß die Reaktion nur katalytische Mengen an Coenzym erfordert. Der Ansatz enthielt im einzelnen (in Klammern aufgeführt sind die Endkonzentrationen der Komponenten im Test): 20 µl NADP (0,05 mM), 7,7 µl Isopropanol (0,1 M), 0,6 µl Acetophenon (5 mM), 921,7 µl Triethanolamin-Puffer (50 mM; pH 7,0, mit 1 mM MgCl₂) und 50 µl Alkohol Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (4,5 Units). Dieser Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde für 24 Std. bei 30°C inkubiert, dann wurde eine Probe gaschromatographisch analysiert. Dazu wurden 100 µl entnommen, mit 100 µl Chloroform ausgeschüttelt, die Phasen durch Zentrifugation getrennt und aus der Unterphase (Chloroform) ein Aliquot für die GC entnommen.

Trennbedingungen für die Trennung von (R)- und (S)-Phenylethanol am Gaschromatographen: Stationäre Phase: Lipodex E, CD-Säule (Macherey und Nagel, Düren), Mobile Phase: Helium, Injektionsvolumen: 1 µl, Detektion: FID, Temperatur: 110°C. Unter diesen Bedingungen wird das Substrat Acetophenon bei 10,5 min eluiert, (S)-Phenylethanol bei 13,8 min und (R)-Phenylethanol bei 14,2 min. Die Retentionswerte für (S)- und (R)-Phenylethanol können mit einem kommerziell erhältlichen, racemischen Gemisch (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz) erhalten werden. Nach 24 Std. sind mehr als 95% des Substrats umgesetzt worden, das GC-Chromatogramm zeigt folgende Werte: Acetophenon (Retentionszeit 10,5 min): area = 9.800; (S)-Phenylethanol (Retentionszeit 13,8 min): area = < 500; (R)-Phenylethanol (Retentionszeit 14,2 min): area = 240.000.

Legende zu Abb. 1

DNA- und Proteinsequenz der rekombinanten ADH aus *L. brevis* in *E. coli* (obere Zeile jeweils die Nukleinsäuresequenz (SEQ. ID NO: 7), darunter die dem Tripletcode entsprechende Aminosäure-Sequenz (im Einbuchstaben-Code, SEQ. ID NO: 8)). Die Sequenz beginnt mit Methionin, das über einen Start-Codon eingefügt worden ist. Dieses Methionin findet man nicht bei der entsprechenden Aminosäure-Sequenz, die durch Sequenzierung des reinen Proteins erhalten wurde (N-terminales Ende; s. Beispiel 3F und Beispiel 4).

Patentansprüche

1. Stabiles mikrobielles Enzym mit Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß es

nach ca. 30 Minuten bei 20° bis 60°C mindestens 95% Restaktivität aufweist und bis zu einer spezifischen Aktivität von mindestens 400 U/mg reinigbar ist.

2. Enzym nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Stabilitätsmaximum bei ca. 40°C und pH 9.0 aufweist.

3. Enzym nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym ein Stabilitätsmaximum bei pH 5.5 aufweist.

4. Enzym nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Aktivitätsmaximum des Enzyms bei ca. 50°C liegt.

5. Stabiles mikrobielles Enzym mit Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von ca. 104 kDa (Gelfiltration) aufweist und in Aminosäure-Position 1, 2, 5, 24 und/oder 34 entsprechend einen Serin-, Asparagin-, Asparaginsäure-, Theonin- und/oder Methioninrest aufweist.

6. Enzym nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym aus Stämmen der Gattung *Lactobacillus* erhältlich ist.

7. Enzym nach einem der vorangegangenen Ansprüche erhältlich aus *Lactobacillus brevis* (DSM 20054).

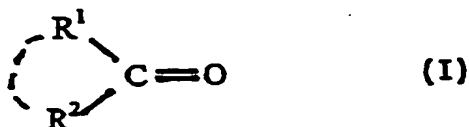
8. Stabile Alkohol-Dehydrogenase, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym im wesentlichen eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ. ID NO: 8 aufweist.

9. Stabile Alkohol-Dehydrogenase für die eine DNA-Sequenz gemäß SEQ. ID NO: 7 bzw. entsprechende Analoga codieren.

10. Verfahren zur Gewinnung des Enzyms nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine gegebenenfalls mit einem für ADH codierenden Gen transformierte Mikroorganismusprobe aufgeschlossen wird und anschließend einer hydrophoben Interaktionschromatographie, einer Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie in geeigneten, Magnesiumionen enthaltenen Puffersystemen unterworfen wird.

11. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Mikroorganismus um *Lactobacillus brevis* (DSM 20054) handelt.

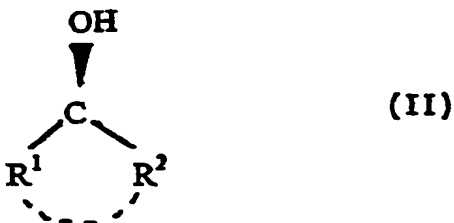
12. Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von organischen Ketoverbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der allgemeinen Formel (I)



wobei

R¹ oder R², verschieden oder identisch, Wasserstoff, zusammen oder einzeln, ein Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- oder Arylenylrest, jeweils verzweigt oder geradkettig, bestehend aus 1 bis 20 C-Atomen, die durch ein oder mehrere Halogenatome, Nitro-, Hydroxyl- oder Alkoxyreste, wobei die Alkoxyreste aus 1 bis 20 C-Atomen aufweisen, eine gegebenenfalls substituierte C1–C10-Alkylengruppe, die durch gesättigte, ungesättigte oder aromatische Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelheterocyclen substituiert sind, oder ein gegebenenfalls substituiertes polykondensierter gesättigter und/oder aromatischer Rest sein können, dadurch gekennzeichnet, daß eine Ketoverbindung bzw. ein entsprechendes Gemisch in Gegenwart einer Alkohol-Dehydrogenase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 bzw. das Enzym enthaltenen Zellen zwischen ca. 20° und 60°C über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten bis 3 Stunden inkubiert und die entsprechende R-Hydroxyverbindung isoliert wird.

13. Verfahren zur enantioselektiven Synthese von organischen Hydroxyverbindungen gemäß der allgemeinen Formel (II)



wobei

R¹ oder R², verschieden oder identisch, Wasserstoff, zusammen oder einzeln, ein Alkyl-, Alkenyl-, Aryl- oder Arylenylrest, jeweils verzweigt oder geradkettig, bestehend aus 1 bis 20 C-Atomen, die durch ein oder mehrere Halogenatome, Nitro-, Hydroxyl- oder Alkoxyreste, wobei die Alkoxyreste aus 1 bis 20 C-Atomen aufweisen, ein gegebenenfalls substituierte C1–C10-Alkylengruppe, die durch gesättigte, ungesättigte oder aromatische Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelheterocyclen substituiert sind, oder ein gegebenenfalls substituiertes polykondensierter gesättigter und/oder aromatischer Rest sein können, dadurch gekennzeichnet, daß ein racemisches Gemisch der organischen Hydroxyverbindung mit einer Alkohol-Dehydrogenase gemäß der Ansprüche 1 bis 9 bzw. das Enzym enthaltenen Zellen zwischen ca. 20°

und 60°C über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten bis 3 Stunden inkubiert und die entsprechende S-Hydroxyverbindung isoliert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß Magnesiumionen zugegen sind und der pH-Wert zwischen 6 und 9 liegt.

15. Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer stabilen Alkohol-Dehydrogenase, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz gemäß SEQ. ID NO: 7 in einer eukaryotischen oder prokaryotischen Zelle exprimiert wird. 5

16. Isoliertes DNA-Fragment, welches für eine stabile Alkohol-Dehydrogenase codiert, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ. ID NO: 7 bzw. eine damit hybridisierende Sequenz enthält. 10

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Abb. 1

ATG TCT AAC CGT TTG GAT GGT AAG GTA GCA ATC ATT ACA GGT GGT ACG
M S N R L D G K V A I I T G G T
TTG GGT ATC GGT TTA GCT ATC GCC ACG AAG TTC GTT GAA GAA GGG
L G I G L A I A T K F V E E G
GCT AAG GTC ATG ATT ACC GGC CGG CAC AGC GAT GTT GGT GAA AAA
A K V M I T G R H S D V G E K
GCA GCT AAG AGT GTC GGC ACT CCT GAT CAG ATT CAA TTT TTC CAA CAT
A A K S V G T P D Q I Q F F Q H
GAT TCT TCC GAT GAA GAC GGC TGG ACG AAA TTA TTC GAT GCA ACG GAA
D S S D E D G W T K L F D A T E
AAA GCC TTT GGC CCA GTT TCT ACA TTA GTT AAT AAC GCT GGG ATC
K A F G P V S T L V N N A G I
GCG GTT AAC AAG AGT GTC GAA GAA ACC ACG ACT GCT GAA TGG CGT
A V N K S V E E T T T A E W R
AAA TTA TTA GCC GTC AAC CTT GAT GGT GTC TTC TTC GGT ACC CGA TTA
K L L A V N L D G V F F G T R L
GGG ATT CAA CGG ATG AAG AAC AAA GGC TTA GGG GCT TCC ATC ATC
G I Q R M K N K G L G A S I I
AAC ATG TCT TCG ATC GAA GGC TTT GTG GGT GAT CCT AGC TTA GGG GCT
N M S S I E G F V G D P S L G A
TAC AAC GCA TCT AAA GGG GCC GTA CGG ATT ATG TCC AAG TCA GCT
Y N A S K G A V R I M S K S A
GCC TTA GAT TGT GCC CTA AAG GAC TAC GAT GTT CGG GTA AAC ACT GTT
A L D C A L K D Y D V R V N T V
CAC CCT GGC TAC ATC AAG ACA CCA TTG GTT GAT GAC CTA CCA GGG
H P G Y I K T P L V D D L P G
GCC GAA GAA GCG ATG TCA CAA CGG ACC AAG ACG CCA ATG GGC CAT
A E E A M S Q R T K T P M G H
ATC GCT GAA CCT AAC GAT ATT GCC TAC ATC TGT GTT TAC TTG GCT TCT
I G E P N D I A Y I C V Y L A S
AAC GAA TCT AAA TTT GCA ACG GGT TCT GAA TTC GTA GTT GAC GGT GGC
N E S K F A T G S E F V V D G G
TAC ACT GCT CAA
Y T A Q